

DIN EN 17697

ICS 65.120

Einsprüche bis 2021-09-23

Entwurf

**Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
PFGE-Typisierung von Laktobazillen, Pediokokken, Enterokokken und
Bazillen;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17697:2021**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis –
PFGE typing of Lactobacilli, Pediococci, Enterococci and Bacilli;
German and English version prEN 17697:2021

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2021-07-23 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs
besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-
Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de,
sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im
Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-
Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL),
10772 Berlin oder Saatwinkler Damm 42/43, 13627 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten
Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 34 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17697:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-03-03 AA „Futtermittel“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Titel de: Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungsverfahren —
PFGE-Typisierung von Laktobazillen, Pediokokken, Enterokokken und
Bazillen

Titel en: Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis — PFGE typing of
Lactobacilli, Pediococci, Enterococci and Bacilli

Titel fr:

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort.....	3
Einleitung.....	4
1 Anwendungsbereich.....	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung.....	6
5 Reagenzien.....	6
6 Medien	8
6.1 MRS (Laktobazillen, Pediokokken).....	8
6.2 Trypton-Soja-Bouillon (Enterokokken, Bazillen).....	8
7 Geräte.....	8
8 Durchführung.....	9
8.1 Ernten der Zellen.....	9
8.2 Herstellung von Blöckchen	10
8.3 Lysis der Zellen.....	10
8.4 Restriktion chromosomaler DNA.....	10
8.5 Herstellung von Gelen und PFGE.....	11
8.6 Visualisierung und Auswertung.....	11
9 Untersuchungsbericht.....	13
Anhang A (informativ) Zusammenfassung der Validierungsstudie.....	14
A.1 Allgemeines.....	14
A.2 Ringversuch.....	14
Literaturhinweise.....	16

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17697:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission CEN erteilt hat.

Einleitung

DNA-Fingerprinting (Bestimmung des genetischen Fingerabdrucks) mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) ermöglicht den Vergleich von großen Restriktionsfragmenten, die größer als 50 kb sind. Diese Technik in Kombination mit der Restriktion des DNA-Moleküls durch selten schneidende Endonucleasen (die Sequenzen von 6 oder 8 Basenpaaren erkennen) wurde erfolgreich auf die Stammtypisierung verschiedener Milchsäurebakterien einschließlich Laktobazillen und Pediokokken angewendet.

Das in diesem Dokument beschriebene Verfahren legt die Vorbereitung von genomischer DNA für die Pulsfeld-Gelelektrophorese und weitere Einzelheiten des Verfahrens der PFGE-Typisierung fest.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt eine Methodik der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) zur Identifizierung zugelassener probiotischer *Lactobacillus*-, *Pediococcus*-, *Enterococcus*- und *Bacillus*-Stämme fest. Das Verfahren kann auf gereinigte Kolonien angewendet werden, die aus kultivierten Vormischungen und Futtermitteln gewonnen werden, um das Vorhandensein von Stämmen, die als Futtermittelzusatzstoffe in deklarierten Konzentrationen verwendet werden, sogar vor einem möglichen mikrobiellen Hintergrund, der aus nicht sterilen Matrices resultiert.

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

3.1

Bazillen

beliebige von verschiedenen stäbchenförmigen, sporenbildenden Bakterien der Familie Bacillaceae

3.2

Enterokokken

grampositive, Katalase-negative Kokken, die meist paarweise oder kurzkettig auftreten

Anmerkung 1 zum Begriff: Diese Beschreibung basiert auf den Eigenschaften, wie sie in diesem Dokument definiert werden.

Anmerkung 2 zum Begriff: Enterokokken werden als aerotolerante Anaerobier mit der Fähigkeit eingestuft, 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid zu Formazan zu reduzieren und Äsculin bei $44\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ zu hydrolysieren. Sie bilden Kolonien, die der Beschreibung dieser Art auf den festgelegten Nährmedien nach der Bebrütung von 24 h bzw. 48 h bei einer Temperatur von 37 °C unter aeroben Bedingungen entsprechen.

[QUELLE: EN 15788:2020, 3.1]

3.3

Laktobazillen

grampositive, Katalase-negative, stäbchenförmige, in Ketten angeordnete Bakterien

Anmerkung 1 zum Begriff: Diese Beschreibung basiert auf den Eigenschaften, wie sie in diesem Dokument definiert werden.

Anmerkung 2 zum Begriff: Laktobazillen bilden Kolonien, die der Beschreibung dieser Arten auf den festgelegten selektiven Nährmedien nach einer Bebrütungsdauer von 48 h bis 72 h bei einer Temperatur von 37 °C unter anaeroben Bedingungen entsprechen (siehe 9.7).

[QUELLE: EN 15787:2020, 3.1]

3.4

Pediokokken

grampositive, Katalase negative unbewegliche Kokken, die sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen wachsen

Anmerkung 1 zum Begriff: Diese Beschreibung basiert auf den Eigenschaften, wie sie in diesem Dokument definiert werden.

Anmerkung 2 zum Begriff: Pediokokken treten meist in Paaren oder Tetraden auf, selten in Ketten oder einzeln, und teilen sich entlang zweier Symmetrieebenen. Sie bilden Kolonien, die der Beschreibung dieser Arten auf den festgelegten selektiven Nährmedien nach einer Bebrütungsdauer von 48 h bis 72 h bei einer Temperatur von 37 °C unter aeroben oder anaeroben Bedingungen entsprechen (siehe 9.7).

[QUELLE: EN 15786:2020, 3.1]

4 Kurzbeschreibung

Einzelne Kolonien können von den verwendeten geeigneten Medien ausgewählt werden, die unter Verwendung des besten verfügbaren spezifischen Zählverfahrens erhalten wurden, wie zum Beispiel in den CEN-Verfahren für die Zählung von probiotischen Laktobazillen, Pediokokken und Enterokokken [7] [8] [9] [10] beschrieben. Diese werden über Nacht bei 37 °C in 10 ml Flüssigkulturen kultiviert. Die Zellen werden durch Zentrifugation geerntet und in Agarblöckchen eingeschlossen, wo sie dann einer Lysis, Restriktion chromosomaler DNA und PFGE zur Auftrennung der so erhaltenen DNA-Fragmente unterzogen werden.

Genomische DNA aus Pediokokken oder Laktobazillen wurde durch Modifizierung und Anpassung gut bekannter, zuvor beschriebener Verfahren (Tynkkynen et al., 1999, Luchansky et al., 1992, Smith und Cantor, 1987) für PFGE vorbereitet. Die von Turabelidze et al. (2002) und Zhang et al. (2016) beschriebenen Verfahren wurden für Enterokokken bzw. Bazillen angepasst.

Das Verfahren wurde im Rahmen des EU-Forschungsvertrags Nr. SMT4-CT98-2235 („Methods for the Official Control of Probiotics Used as Feed Additives“ [Verfahren für die amtliche Untersuchung von Probiotika, die als Futtermittelzusatzstoffe eingesetzt werden]) entwickelt und beurteilt.

Das Verfahren wurde während des Ringversuchs weiter optimiert und vollständig validiert. Eine Zusammenfassung des Ringversuchs kann Anhang A „Zusammenfassung der Validierungsstudie“ entnommen werden.

5 Reagenzien

5.1 Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid (Tris-HCl)

5.2 Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

5.3 TE-Puffer: TE 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, einstellen auf pH 8,0 und autoklavieren

5.4 Lysozym (≥ 20 000 U/mg)

5.4.1 Lysozym-Stammlösung

300 000 U Lysozym (etwa 150 mg/ml bis 200 mg/ml bei den meisten handelsüblichen Lysozym-Präparaten) je ml TE-Puffer (5.3). Aufteilung in aliquote Anteile (100 µl bis 200 µl), Aufbewahrung bei –20 °C, Auftauen bei Raumtemperatur, Verwendung unmittelbar nach dem Auftauen.

5.5 Mutanolysin ($\geq 4\,000\text{ U/mg}$)

5.5.1 Mutanolysin-Stammlösung

2 500 U Mutanolysin je ml TE-Puffer (5.3). Aufteilung in aliquote Anteile (100 μl bis 200 μl), Aufbewahrung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, Auftauen bei Raumtemperatur, Verwendung unmittelbar nach dem Auftauen.

5.6 Proteinase K ($\geq 2,5\text{ U/mg}$)

5.6.1 Proteinase K-Stammlösung

50 U Proteinase K je ml TE-Puffer (5.3) (50 U/ml). Aufteilung in aliquote Anteile (100 μl bis 200 μl), Aufbewahrung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, Auftauen bei Raumtemperatur, Verwendung unmittelbar nach dem Auftauen.

5.7 N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz (Sarkosyl)

5.7.1 Sarkosyl-Lösung: Sarkosyl 1 % (m/V) in 100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, pH 8

5.8 Proteinase K-Inhibitor-Lösung

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 17,5 mg/ml in Isopropanol.

5.9 TBE, 10-fach konzentriert

1 M Tris-HCl, 0,9 M Borsäure, 0,01 M EDTA, pH 8,4.

5.10 Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt

2 % in 0,5-fach konzentriertem TBE-Puffer (mischen und in einem Mikrowellengerät schmelzen, vor dem Gebrauch auf $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ halten).

5.11 Agarose, zertifiziert für die Verwendung im Pulsfeld

1 % in 0,5-fach konzentriertem TBE-Puffer (mischen und in einem Mikrowellengerät schmelzen, vor dem Gebrauch auf $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ halten).

5.12 Restriktionsenzyme (und entsprechende Restriktionspuffer)

5.12.1 Sfil (Laktobazillen)

5.12.2 Smal (Laktobazillen, Pediokokken und Enterokokken)

5.12.3 Spel (Bazillen)

5.13 Molekulargewichtsmarker (z. B. 10 kbp bis 250 kbp)

5.14 Ethidiumbromid

6 Medien

6.1 MRS (Laktobazillen, Pediokokken)

- Dikaliumhydrogenphosphat, 2 g/l
- Magnesiumsulfat-Heptahydrat, 0,2 g/l
- Mangansulfat-Tetrahydrat, 0,05 g/l
- Fleischextrakt, 8 g/l
- Pepton, 10 g/l
- Natriumacetat-Trihydrat, 5 g/l
- Hefeextrakt, 4 g/l
- destilliertes Wasser, bis zu 1 l
- pH-Wert: $6,2 \pm 0,2$

6.2 Trypton-Soja-Bouillon (Enterokokken, Bazillen)

- Caseinpepton, 17 g/l
- Dikaliumhydrogenphosphat, 2,5 g/l
- Glucose, 2,5 g/l
- Sojapepton, 3 g/l
- destilliertes Wasser, bis zu 1 l
- endgültiger pH-Wert: $7,3 \pm 0,2$

7 Geräte

7.1 Gelelektrophorese

7.1.1 Pulsfeld-Gelelektrophoresesystem mit konturgespannten homogenen elektrischen Feldern (en: Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields, CHEF)

Einschließlich Kammer und Netzteil, die mit konstanter Spannung betrieben werden können.

7.1.2 Mikrowellengerät

7.1.3 Erlenmeyerkolben

7.1.4 Wasserbad

7.1.5 Blöckchengießformen (werden üblicherweise zusammen mit dem PFGE-Gerät zur Verfügung gestellt)

7.1.6 Konische Zentrifugenröhrchen (50 ml)

7.1.7 Siebdeckel

Für die konischen Zentrifugenröhrchen; werden üblicherweise zusammen mit dem PFGE-Gerät zur Verfügung gestellt.

7.1.8 Bildanalysesystem oder Polaroidkamera und Transilluminator

7.1.9 Thermoblock

Größe 250 ml, für 80 ml bis 100 ml Agarosezubereitung.

7.2 Turbidimeter

7.3 Kühlschrank

7.4 Tiefgefriereinrichtung

7.5 Tischzentrifuge

7.6 Zentrifugenröhrchen

7.6.1 Konische Röhrchen, 50 ml

7.6.2 Konische Röhrchen, 15 ml

7.6.3 Eppendorf-Röhrchen, 1,5 ml

7.7 Waage

Geeignet zum Wägen auf 0,01 g.

7.8 Automatische Pipetten und Pipettenspitzen (Bereich: 2 µl bis 1 000 µl)

7.9 Impfösen zum Überimpfen

8 Durchführung

8.1 Ernten der Zellen

Die Kolonien werden von den entsprechenden Agarplatten geerntet und in 10 ml eines geeigneten Mediums suspendiert (siehe 4 zu Zählverfahren) (6). Nach einer Bebrütung über Nacht bei $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ werden die Zellen durch Zentrifugation (1 800 g, 5 min) geerntet, in einem geeigneten Volumen TE-Puffer (5.3) suspendiert und die optische Dichte (Extinktion) der Suspensionen wird bei einer Wellenlänge von 625 nm und einer optischen Weglänge von 1 cm auf OD₆₂₅ von 1 bis 1,5 (Laktobazillen, Pediokokken und Bazillen) oder von 0,8 bis 1,0 (Enterokokken) eingestellt. Anschließend werden aliquote Anteile von 3,5 ml zentrifugiert (1 800 g, 5 min), mit 10 ml TE-Puffer gewaschen und abschließend in 600 µl TE-Puffer suspendiert.

Alternativ für Enterokokken und Bazillen: Eine frische, über Nacht bebrütete Platte wird genommen und mit einer Impföse wird die Bakterienmasse direkt in 5 ml TE-Puffer (5.3) suspendiert. Die OD₆₂₅ wird entweder auf 1 bis 1,5 (Bazillen) oder 0,8 bis 1,0 (Enterokokken) eingestellt. Nach dem Ernten der Zellen mittels Zentrifugation ($4\,000\text{ min}^{-1}$, 5 min) werden die Zellen in 600 µl TE-Puffer suspendiert.